บทที่ 1

บทนำ

สารปฏิชีวนะ(Antibiotic) หมายถึง สารที่ผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งโดยมีความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งได้ด้วยปริมาณเพียงเล็กน้อย ยกเว้น กรดอินทรีย์ สารกลุ่มเปอร์ออกไซด์ และแอลกอฮอล์(Wakmans , 1961) อย่างไรก็ตามได้มีรายงานว่าแต่เดิมสารปฏิชีวนะนั้นมีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่น Toxin Lysin Bacteriostatic agent หรือ Mycocidal agent เป็นต้น (Foye , 1976)

ในปัจจุบันสารปฏิชีวนะนอกจากจะผลิตได้จากจุลินทรีย์แล้ว ยังสังเคราะห์ได้โดยกระบวนการทางเคมี (Chemical synthesis) และกระบวนการสังเคราะห์กึ่งเคมี(Semi-synthesis) ในกระบวนการสังเคราะห์กึ่งเคมี เป็นการนำผลิตภัณฑ์ส่วนหลักที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ไปปรับปรุงโครงสร้าง(Modify) โดยวิธีทางเคมีเพื่อให้ได้อนุพันธ์ของสารปฏิชีวนะ (Hugo and Russal , 1984) ทำให้เกิดสารปฏิชีวนะมากกว่า 30,000 ชนิด ที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์กึ่งเคมีเกิดขึ้นในปัจจุบัน (Vandamme , 1984)

แหล่งสร้างสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่ได้มาจากจุลินทรีย์ กลุ่มที่มีบทบาทมากในการผลิต ได้แก่ แอกติโนมัยซิสในสกุล Streptomyces แบคทีเรียในสกุล Bacillus และราในสกุล Penicillium โดยสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ประมาณ 4600 950 และ 1600 ชนิดตามลำดับ (Versall , 1985)

สารปฏิชีวนะจัดเป็นเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary Metabolite) หรือเรียกว่าเป็นผลิตภัณฑ์แบบที่ไม่สัมพันธ์กับการเจริญ (Nongrowth-associated product) (Berdy , 1977 ; Martin and Demain , 1980 ; Paryski , 1967 ; Sakaguchi , 1971) กล่าวคือสารนี้ถูกสร้างเมื่อจุลินทรีย์อยู่ในปลายระยะการเจริญแบบเพิ่มจำนวน (Late log phase)และเริ่มเข้าสู่ระยะพัก (Stationary phase) สารปฏิชีวนะเป็นผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นโดยมีความเกี่ยวข้องกับกลไลบางอย่างของจุลินทรีย์ ซึ่งสันนิษฐานว่าอาจเกี่ยวข้องในกระบวนการเปลี่ยนแปลงในเซล เช่น การเปลี่ยนแปลงจากเซลปกติ (Vegetative cell) ไปเป็นเซลสืบพันธุ์ (Reproductive Cell) คือ สปอร์(Spore) เป็นต้น ซึ่งปรากฏจากหลักฐานว่าสารปฏิชีวนะหลายชนิดจะถูก

สร้างไปพร้อมๆกับการเกิดของสปอร์ (Katz and Demain , 1977) หรืออาจเกี่ยวข้องกับเมตาบอลิสมบางอย่าง เช่น เป็นสารที่ย่อยสลายผลิตภัณฑ์ที่โมเลกุลขนาดใหญ่ๆ (Hutter et al., 1978) นอกจากนี้ยังพบว่าสารปฏิชีวนะมีบทบาทในธรรมชาติ โดยจะช่วยทำลายและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดความเสียหาย โดยจะพบปริมาณของจุลินทรีย์ที่ผลิตสารปฏิชีวนะมาก ในบริเวณที่มีการย่อยสลายและการผุพัง เช่น บริเวณรากพืชที่เกิดความเสียหายเนื่องจากปาราสิต (Gottlieb , 1976 ; Vandamme , 1984 ; Phae et al. , 1990) การผลิตสารปฏิชีวนะมักเกิดขึ้นในภาวะที่มีการขาดแคลนอาหาร (Lichstein , 1983 ; Marahiel et al., 1993) และมีกลไลในการควบคุมที่ซับซ้อนไม่ว่าจะเป็นการชักนำการสร้าง(Induction) การควบคุมแบบคาตาบอไลต์ (Catabolite Repression) การถูกควบคุมโดยผลิตภัณฑ์ (Feedback Regulation)

สารปฏิชีวนะจัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความสำคัญและมีประโยชน์มาก ได้มีการประยุกต์ใช้ในหลายๆ ด้าน เช่น

ยารักษาโรค ในทางการแพทย์จะใช้สารปฏิชีวนะ เป็นยารักษาโรคติดเชื้อ (Infection diseases) ซึ่งเรียกว่ายาปฏิชีวนะ ลักษณะของยาปฏิชีวนะที่ดีจะต้องมีคุณสมบัติในการคัดเลือกความเป็นพิษ(Selective toxicity) กล่าวคือ สามารถทำลายจุลินทรีย์แต่ไม่ทำลายเซลเจ้าบ้าน (Host cell) มีผลข้างเคียงน้อยและความเสถียรสูง ยาปฏิชีวนะที่ใช้กันทั่วไปและเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ Penicillin Tetracycline Bacitracin เป็นต้น (Wilson and Schild , 1968 ; Miller and Lisky , 1976)

สารถนอมอาหาร (Food preservative) ในการป้องกันการเน่าเสียของอาหารเนื่องมาจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ได้มีการนำสารปฏิชีวนะมาใช้ เช่น Nisin เป็นสารถนอมอาหารที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายและเป็นที่ยอมรับ ได้มีการใช้สารนี้แล้วใน 57 ประเทศทั่วโลก (Bower et al., 1995 ; Dreissen et al., 1995 ; Jack et al., 1995)

สารควบคุมทางชีวภาพ (Biological control) เนื่องจากในปัจจุบันมีการใช้สารเคมีในทางเกษตรและอุตสาหกรรมต่างๆมากมาย ทำให้มีการตกค้างของสารเคมี และเป็นผลทำให้เกิดสภาวะแวดล้อมเป็นพิษ การควบคุมทางชีวภาพจึงเป็นแนวทางแก้ไขอีกทางหนึ่ง โดยอาจใช้ตัวจุลินทรีย์หรือสารที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นเป็นตัวควบคุม เช่น การใช้สาร AFV (Antifungal volatile) ที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* ในการควบคุมเชื้อรา *Rhizoctonia solani* (Fiddaman and Rossall , 1994) หรือการใช้ Gramicidin S ที่ผลิตได้

จาก *Bacillus brevis* ในการควบคุมเชื้อรา Fusarium ที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวในพืชเศรษฐกิจ (Murrey et al., 1986)

สารช่วยส่งเสริมการเจริญในสัตว์ (Feed additive) พบว่าถ้ามีการใช้สารปฏิชีวนะบางชนิดเติมลงไปในอาหารสัตว์ในปริมาณที่เหมาะสมแล้ว นอกจากจะทำช่วยเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์แล้วยังช่วยป้องกันโรคได้อีกด้วย สารปฏิชีวนะที่นิยมเติมลงในอาหารสัตว์ได้แก่ Oxytetracycline Bambermycin และ Bacitracin เป็นต้น (มาลินี , 2525)

<u>การจัดจำแนกสารปฏิชีวนะ</u>

ในการจัดจำแนกสารปฏิชีวนะสามารถจำแนกได้โดยอาศัยโครงสร้างทางเคมีเป็นหลัก จัดตามแหล่งที่มา หรือจัดตามกลไกการออกฤทธิ์ สำหรับการจัดจำแนกตามสูตรโครงสร้างทางเคมีสามารถแบ่งสารปฏิชีวนะออกเป็น 9 กลุ่ม ดังนี้ (Versall , 1985 ; Brock and Medigan , 1991)

1. Carbohydrate-containing antibiotics ได้แก่
    1. 1 Pure saccharide
    1. 2 Aminoglycoside antibiotics
    1. 3 Other (N-and C-) glycosides
    1. 4 Various sugar derivatives
2. Macrocyclic lactone (LACTAM) antibiotics ได้แก่
    2. 1 Macrolide antibiotics
    2. 2 Polyene antibiotics
    2. 3 Other macrolide lactone antibiotics
    2. 4 Macrolactam antibiotics
3. Quinone and similar antibiotics ได้แก่
    3. 1 Linear condensed polycyclic compounds
    3. 2 Naphthoquinone derivatives
    3. 3 Benzoquinone derivatives
    3. 4 Various quinonelike compounds
4. Amino acid , Peptide antibiotics ได้แก่

4. 1 Amino acid derivatives

4. 2 Homopeptides

4. 3 Heteromer peptides

4. 4 Peptolides

4. 5 High molecular weight peptides

5. Nitrogen-containing heterocyclic antibiotics ได้แก่

5. 1 Noncondensd (single) heterocyclics

5. 2 condensd (fused) heterocyclics

5. 3 Alkaloids with antibiotic (antitumour) activity

6. Oxygen-cotaining heterocyclic antibiotics ได้แก่

6. 1 Furan derivatives

6. 2 Pyran derivatives

6. 3 Benzopyran derivatives

6. 4 Small lactone

6. 5 Polyether antibiotics

7. Alicyclic antibiotics ได้แก่

7. 1 Cycloalkane derivatives

7. 2 Small terpene

7. 3 Oligoterpene antibiotics

8. Aromatic antibiotics ได้แก่

8. 1 Benzene compounds

8. 2 Condensed aromatic compounds

8. 3 Nonbenzoid aromatic compounds

8. 4 Various derivatives of aromatic compounds

9. Aliphatic antibiotics ได้แก่

9. 1 Alkane derivatives

9. 2 Aliphatic carboxylic acid derivatives

9. 3 Aliphatic compound with S and P compound

พระมุขมนตรี ... จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในจำนวนสารปฏิชีวนะทั้งหมดสารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์ จัดเป็นกลุ่มใหญ่กลุ่มหนึ่ง โดยมีแหล่งผลิตมาจากแบคทีเรียสกุล Bacillus เป็นส่วนใหญ่ (Paryski , 1967) ซึ่งมีรายงานการค้นพบถึง 167 ชนิด (Katz and Demain , 1977) ได้แสดงตัวอย่างของสารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์บางชนิดที่ได้จากสกุล Bacillus ไว้ที่ตารางที่ 1

ได้มีรายงานว่าบางสายพันธุ์ของสกุล Bacillus สามารถสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่มอื่นได้เช่นเดียวกัน ตัวอย่างเช่น *Bacillus cisculans* สามารถผลิต Butirosin ซึ่งจัดเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (Anderson , 1972) และนอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดสามารถสร้างสารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์ได้เช่นกัน ตัวอย่างเช่น *Trichoderma viride* ผลิต Trichotoxin A-40 (Boheim et al., 1978 ; Irmscher et al., 1978) *Staphylococcus epidermidis* ผลิต Epidermin (Allgarier et al., 1986) และ *Streptomyces* sp. OH-4156 ผลิต Cypemycin (Minami et al., 1994) เป็นต้น

สารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์ที่มีแหล่งผลิตจากสกุล Bacillus นั้น มีสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ได้กว้างขวางและแตกต่างกันไป แล้วแต่ชนิดของสารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้น กลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น Tyrothricin Bacitracin (Froyshov , 1974 ; Ishihara and Shimura , 1974) กลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เช่น Bacillomycin (Mhammedi et al., 1982 ; Peypoux et al., 1985 ; Besson and Michel , 1987) Iturin (Peypoux et al., 1978 ; Winkleman , 1983 ; Besson and Michel , 1987) Mycosubtilin (Peypoux et al., 1986) Polymyxin (Shoji et al., 1977) กลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งราและยีสต์ เช่น Cispentacin (Konishi et al ., 1989) Fungicin (Galvez et al., 1994) และกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ เช่น A12-C (Antanio et al., 1993)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์บางชนิดที่ได้จากสกุล Bacillus (Katz and Demain , 1977)

จุลินทรีย์	ชนิดของสารปฏิชีวนะ	
Bacillus brevis	Gramicidin S	Tyrothricin
	Brevin	Edeine
	Eseine	Bresseine
	Brevistine	
Bacillus subtilis	Mycobacillin	Subtilin
	Bacilysin	Bacillomycin
	Fungistatin	Bulbiformin
	Bacillin	Subsporin
	Bacillocin	Mycosubtilin
	Iturin	Neocidin
Bacillus pumilis	Micrococcin P	Tetain
Bacillus mesentericus	Esperin	
Bacillus thiaminolyticus	Baciphelacin	
Bacillus licheniformis	Bacitracin	Licheniformin
	Proticin	
Bacillus polymyxa	Polymycin	Colistin
	Gatavalin	Jolopeptin
Bacillus circulans	Polypeptin	Colistin
Bacillus laterosporus	Laterosporin	
Bacillus cereus	Cerexin	Thiocillin

<u>สมบัติทั่วไปของสารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์</u> (Bodensky and Perlman , 1961 ; Katz and Demain , 1977)

1. มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำคือจะอยู่ในช่วง 270-4500 ดาลตัน เมื่อเทียบกับโปรตีนชนิดอื่นๆ

2. จุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายกลุ่ม โดยแบ่งตามลักษณะองค์ประกอบทางเคมีที่ต่างกัน และสารปฏิชีวนะที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันอาจมีความแตกต่างของกรดอะมิโนเพียงตัวเดียวจนไปถึงหลายๆตัว

3. ในโครงสร้างโมเลกุลอาจจะมีองค์ประกอบอื่นๆ นอกเหนือจากกรดอะมิโน ซึ่งแตกต่างจากโปรตีนทั่วไปที่ได้จากพืชและสัตว์ จะเห็นได้จากในโครงสร้างโมเลกุลของ Colistin ที่ผลิตจาก *Bacillus circulans* จะมีกรดไขมัน 6-methyl-octanoic เป็นองค์ประกอบร่วม

4. มีกรดอะมิโนที่มีลักษณะจำเพาะ (Specific amino acids) ที่ไม่พบในโปรตีนทั่วไปอยู่เป็นองค์ประกอบ ซึ่งได้แสดงไว้ในตารางที่ 2

<u>ตารางที่ 2</u> แสดงกรดอะมิโนที่มีลักษณะจำเพาะ (Specific amino acids) ที่พบในสารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์ (Bodensky and Perlman , 1961)

D-α - Aminoadipic acid	L-Lanthionine
L-α -Amino-β -phenylbutaric acid	N-Methyl-L-Isoleucine
Dehydrobutyrine	L-β -Lysine
2-Aminohexanoic acid	β -Alanine
N,N-Dimethyl-L-cysteine	Dehydroxylanine
N-Hydroxy-L-ornithine	L-β -Methyl-asparic acid
Allo-D-Hydroxyproline	N-Methyl--L-leucine
Allo-D-Isoleucine	β -N-Methyl-L-leucine
L-β-Hydroxyleucine	L-Norvaline
Allo-D-threonine	β-Methyl-l-tryptophane

5. สารปฏิชีวนะกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ จะไม่ถูกย่อยโดยเอ็นไซม์ที่ย่อยโปรตีนโดยทั่วไป (Proteolytic enzymes) ตัวอย่างเช่น โปรติเอส เปปติเดส เป็นต้น

6. โครงสร้างของสารปฏิชีวนะกลุ่มนี้ มักจะเป็นแบบวงแหวน (Cyclic structure) ตัวอย่างเช่น Gramicidin S Tyrocidin แต่โครงสร้างแบบเส้นตรง (Linear structure) ก็พบตัวอย่างเช่น Evidine และ Nisin เป็นต้น

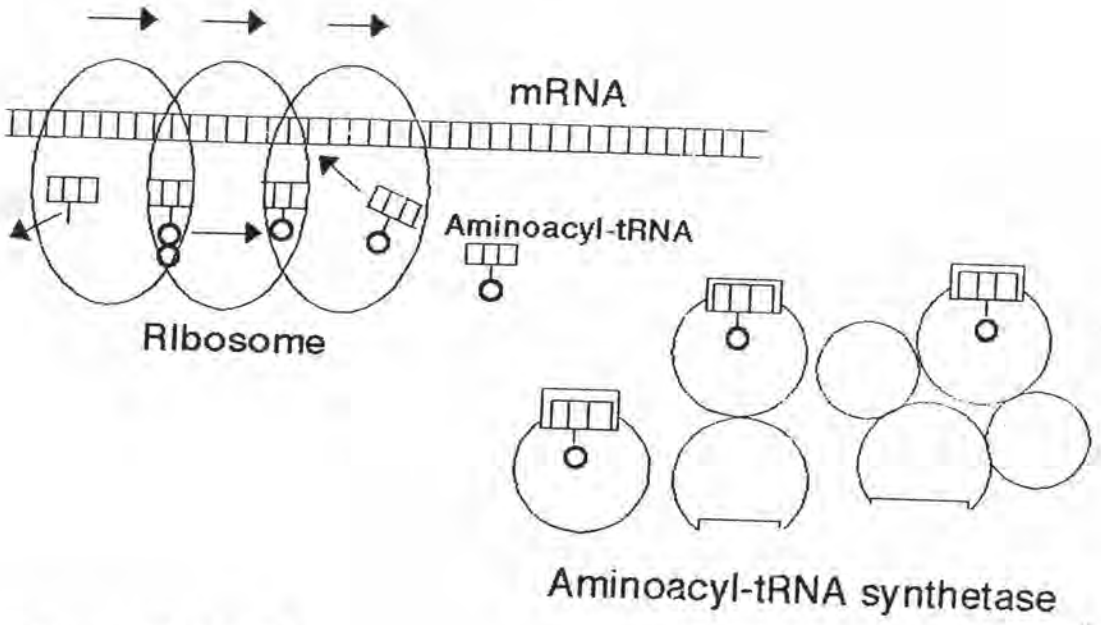
7. มีกระบวนการสังเคราะห์ที่แตกต่างจากการสร้างเพปไทด์ทั่วไป กล่าวคือ การสังเคราะห์จะเกิดขึ้นด้วยระบบของเอ็นไซม์ หรือที่เรียกว่า Nonribosomal synthesis อย่างไรก็ตามภายหลังพบว่ามีการสังเคราะห์แบบ Ribosomal synthesis ด้วย

7. 1 Ribosomal synthesis

ได้มีรายงานในปี คศ. 1987 ของ Kleinkauf และ Dohren และรายงานของ Kolter และ Moreno ในปี คศ. 1992 ว่าสารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์ที่มีกลไกการสังเคราะห์แบบ Ribosomal synthesis นี้อาจเรียกชื่ออีกอย่างหนึ่งว่า Lantibiotic โดยจะมีกรดอะมิโนจำเพาะประเภท Lanthionine หรือ Methyl lanthionine เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างโมเลกุล (Meyer et al., 1994) ในกระบวนการสังเคราะห์จะคล้ายคลึงกับการสังเคราะห์สายเพปไทด์ทั่วไป ซึ่งได้แสดงกลไกการสังเคราะห์ไว้ดังรูปที่ 1 เริ่มจากกรดอะมิโนจะถูกกระตุ้นให้จับกับ tRNA โดย Aminoacyl- tRNA synthetase จากนั้น tRNA ที่จับอยู่กับกรดอะมิโนจะเคลื่อนย้ายไปยัง Ribosome ตามลำดับที่อ่านจาก mRNA กรดอะมิโนที่ถูกนำพาไปจะต่อเชื่อมกันเป็น Prepeptide และจะมีการเปลี่ยนแปลง(Modify) โครงสร้างบนสายเพปไทด์โดยกรดอะมิโนบางชนิด เช่น Serine หรือ Threonine ซึ่งจะเกิดการสูญเสียน้ำแล้วได้เป็น Dehydroalanine และ Dehydrobutyrine ตามลำดับ จากนั้นจะเกิดการสร้าง Thioester linkage ระหว่างกรดอะมิโนที่ Dehydrate กับ Cysteine residue ทำให้ได้เป็นกรดอะมิโนที่ไม่ปกติ (Unusual amino acid) คือ Lanthionine เป็นต้น สารปฏิชีวนะที่มีกระบวนการสังเคราะห์เช่นนี้สามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม ได้แก่

7. 1. 1 Linear shaped lantibiotic ได้แก่ Nisin(Kaletta and Entian , 1989) Subtilin (Klien et al., 1992) Ancovenin (Wakamiya , 1985) Epidermin (Allgarier et al., 1985) Pep5 (Weil et al., 1990)

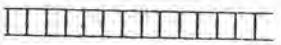
7. 2. 2 Globular shaped lantibiotic ได้แก่ Cinnamycin Duramycin Gallidermin (Kellner et al., 1988)

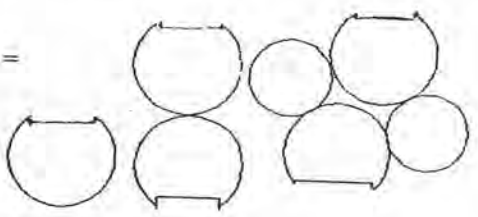


ความหมายของสัญลักษณ์

Amino acid = O

tRNA =

mRNA = 

Aminoacyl -tRNA synthesis = 

<u>รูปที่ 1</u> แสดงการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์แบบ Ribosomal synthesis (Kleinkauf et al., 1987)

7. 2 Nonribosomal synthesis

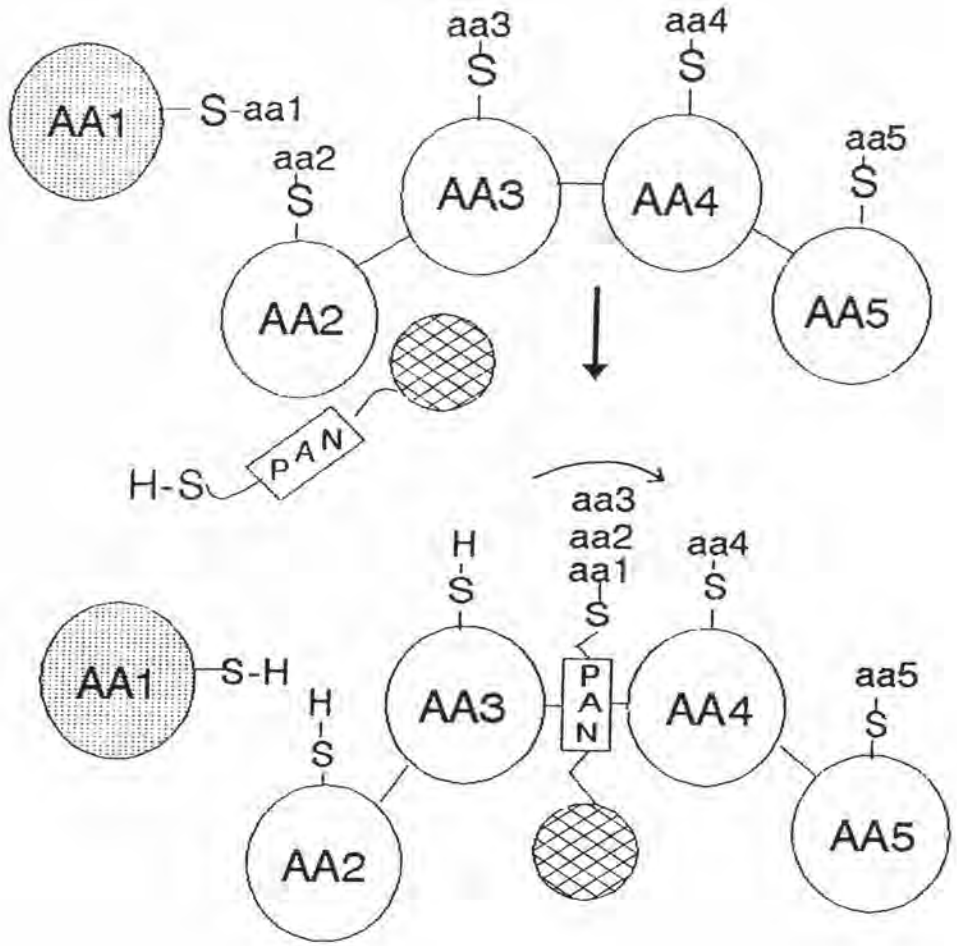
การสังเคราะห์แบบนี้ มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Thiotemplate Multienzyme Mechanism (Umazawa et al., 1978 ; Kleinkauf and Dohren , 1990 ; Preechaborisutkul , 1994) เป็นกลไกที่ถูกเร่งโดยระบบ Multienzyme complex ซึ่งแสดงดังในรูปที่ 2 เริ่มจากกรดอะมิโนถูกกระตุ้นโดย ATP ได้เป็น Aminoacyl-adenylate และถูกเคลื่อนย้ายไปยัง Thiol group ที่อยู่บน Enzyme Domain (AA1 AA2 AA3 AA4 AA5) หลังจากนั้น Enzyme domain จะเกิดการเชื่อมต่อกันกับกรดอะมิโน (aa1 aa2 aa3 aa4 aa5) ด้วย Thioester linkage (S) จากนั้นจะเกิดกระบวนการ Transpeptidation โดยโคแฟกเตอร์ที่ชื่อว่า PAN ซึ่งจับอยู่บน Enzyme subunit ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นสายเพปไทด์ สายเพปไทด์ที่เกิดขึ้นนี้ จะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแตกต่างไปจากที่พบในการสังเคราะห์แบบ Ribosomal synthesis กล่าวคือ กระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจะเกิดการ Methylation ของกรดอะมิโน เป็นต้น สารปฏิชีวนะที่มีกระบวนการสร้างเช่นนี้แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มคือ

7. 2. 1 Linear peptide ได้แก่ Evidine และ Linear Gramicidin

7. 2. 2 Cyclopeptide หรือ Cyclic oligopeptide ได้แก่ Tyrothricin และ Gramicidin S

7. 2. 3 Branched cyclopeptide ได้แก่ Bacitracin และ Polymyxin

7. 2. 4 Cyclic lipopeptide ได้แก่ Surfactin



ความหมายของสัญลักษณ์

Enzyme domain = AA1 AA2 AA3 AA4 AA5

Amino acid = aa1 aa2 aa3 aa4 aa5

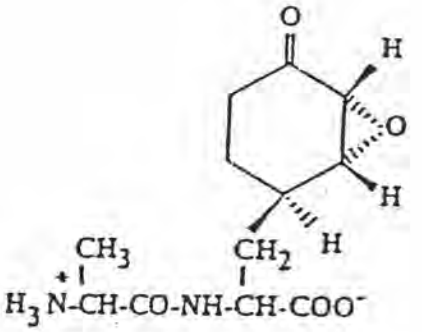
Thioester linkage = S

PAN = Cofactor PAN

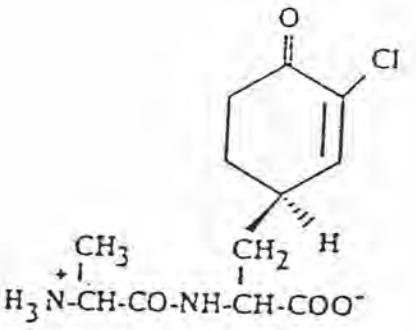
ลูกศรโค้ง(↷) แสดงทิศทางการเคลื่อนที่ของ Cofacter PAN

รูปที่ 2 แสดงการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์แบบ Nonribosomal synthesis (Preechaborisutkul , 1994)

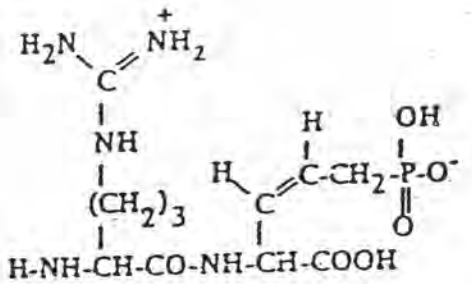
ตัวอย่างโครงสร้างของสารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์ที่ผลิตได้จากสกุล Bacillus



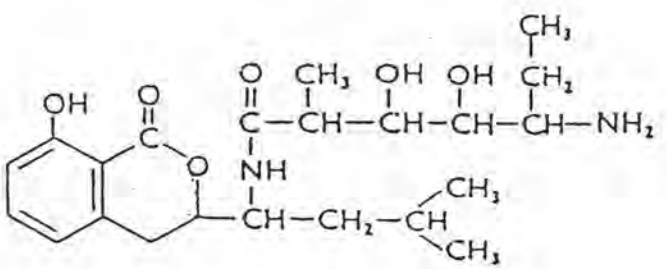
รูปที่ 3 โครงสร้างของ Bacilysin ที่ได้จาก *Bacillus subtilis* (Umezawa et al., 1978)



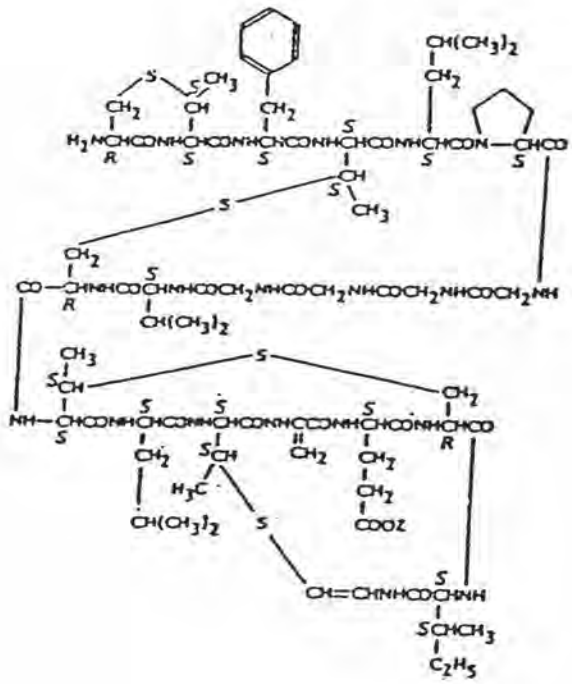
รูปที่ 4 โครงสร้างของ Chlorotetain ที่ได้จาก *Bacillus subtilis* (Umezawa et al., 1978)



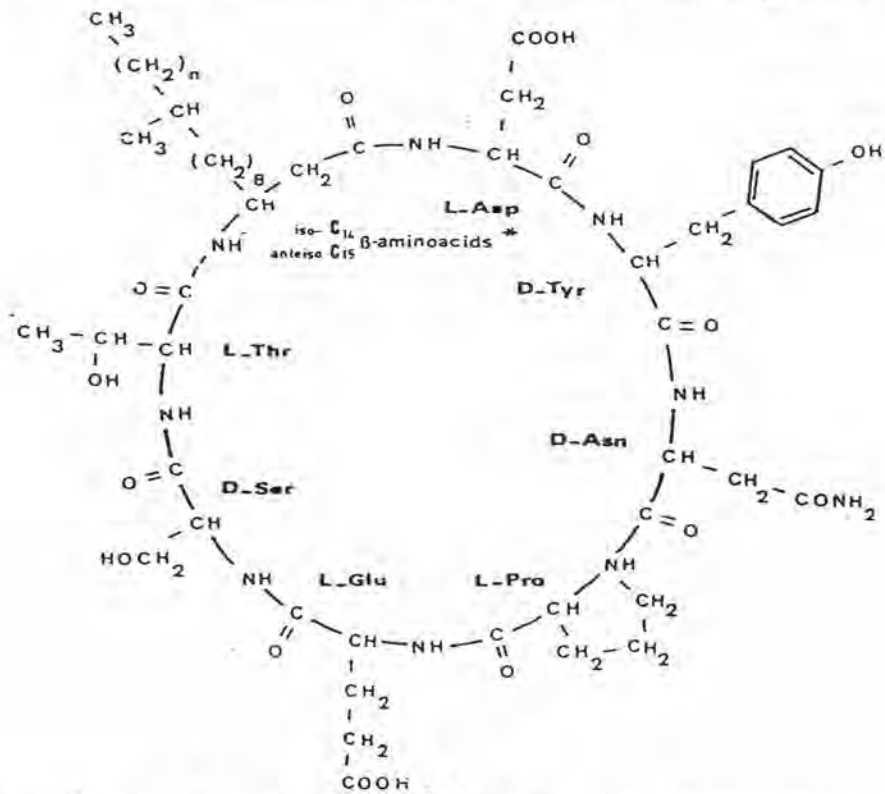
รูปที่ 5 โครงสร้างของ Rhizocticin ที่ได้จาก *Bacillus subtilis* (Umezawa et al., 1978)



รูปที่ 6 โครงสร้างของ Baciphelacin ที่ได้จาก *Bacillus thiaminolyticus* (Okazaki et al., 1978)



<u>รูปที่ 7</u> โครงสร้างของ Mersacidin ที่ได้จาก *Bacillus* sp. HIL-85 (Brotz et al., 1995)



<u>รูปที่ 8</u> โครงสร้างของ Bacillomycin D ที่ได้จาก *Bacillus subtilis* (Peypoux et al., 1981)

ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารปฏิชีวนะ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อจัดเป็นปัจจัยสำคัญ เนื่องจากจุลินทรีย์จะต้องนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลและผลิตพลังงานในการดำรงชีพ อาหารที่มีองค์ประกอบของธาตุอาหารที่จำเป็นจะถูกใช้โดยจุลินทรีย์ เพื่อเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์โดยกระบวนการทางเคมีที่ซับซ้อน (Edward et al., 1981) องค์ประกอบที่สำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความสำคัญต่อการสร้างสารปฏิชีวนะ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน(Carbon source) แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen source) และ แหล่งธาตุปริมาณน้อย (Trace element)

แหล่งคาร์บอน

จุลินทรีย์จะใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อสร้างองค์ประกอบต่างๆ ในเซล และเป็นแหล่งพลังงานสำหรับสร้างสารเมตาบอไลต์ แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีหลายชนิด ตัวอย่างเช่น คาร์โบไฮเดรตในรูป โมโนแซกคาไลน์ โอลิโกแซกคาไลน์ โพลีแซกคาไลน์ โมลาส น้ำมันพืช แอลกอฮอล์ และสารไฮโดรคาร์บอน ในการผลิตสารปฏิชีวนะจุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันออกไป โดยขึ้นกับชนิดของสารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้น และลักษณะทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์เอง (Klier and Rapoport , 1988) เช่น แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะในการผลิต AFV (Antifungal volatile) ใน *Bacillus subtilis* (Fiddaman and Rossall , 1994) ฟรักโตสเหมาะแก่การผลิต Iturin A ใน *Bacillus subtilis* (Peypoux et al., 1978) ในขณะที่กลีเซลรอลเหมาะสำหรับการผลิต Cispentacin ใน *Bacillus cereus* (Konishi et al., 1989) เป็นต้น ในจำนวนแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะ พบว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่มีผลกระทบต่อการสร้างสารปฏิชีวนะมากที่สุด (แสดงไว้ในตารางที่ 3) ทั้งนี้เนื่องจากการใช้กลูโคสจะทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่าคาตาบอไลต์รีเพรสชั่น (Catabolite repression) และนอกจากนี้ยังมีสมมุติฐานว่า กลูโคสไปมีผลต่อเอ็นไซม์จำเพาะที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างสารปฏิชีวนะ (Martin and Demain , 1980) นอกจากนี้กระบวนการย่อยสลายกลูโคสโดยจุลินทรีย์จะเกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก กรดไพรูวิก ทำให้ค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนไป ทำให้มีผลต่อผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (Haavik , 1974)

ตารางที่ 3 แสดงแหล่งคาร์บอนที่มีและไม่มีผลกระทบต่อการสร้างสารปฏิชีวนะบางชนิด (Hutter et al., 1978)

ชนิดของสารปฏิชีวนะ	แหล่งคาร์บอนที่มีผลกระทบต่อการสร้างสารปฏิชีวนะ (Interferring carbon source)	แหล่งคาร์บอนที่ไม่มีผลกระทบต่อการสร้างสารปฏิชีวนะ (Noninterferring carbon source)
Penicillin	กลูโคส	แลคโตส
Actinomycin	กลูโคส	กาแลคโตส
Streptomycin	กลูโคส	แมนโนส
Siomycin	กลูโคส	มอลโตส
Indomycin	กลูโคส	ฟรัสโตส
Bacitracin	กลูโคส	ซิเตรต
Cephalosporin C	กลูโคส	ซูโครส
Chloramphenical	กลูโคส	กลีเซลรอล
Violacein	กลูโคส	มอลโตส
Prodigiocin	กลูโคส	กาแลคโตส
Mitomycin	กลูโคส	กลูโคส(ให้แบบช้าๆ)
Neomycin	กลูโคส	มอลโตส
Kanamycin	กลูโคส	กาแลคโตส
Enniatin	กลูโคส	แลคโตส
Puromycin	กลูโคส	กลีเซลรอล
Novobiocin	กลูโคส	กลูโคส
Candicidin	กลูโคส	กลูโคส(ให้แบบช้าๆ)
Candihexin	กลูโคส	กลูโคส(ให้แบบช้าๆ)
Butirocin	กลูโคส	กลีเซลรอล
Cephamycin	กลีเซลรอล	แป้ง

แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนเป็นแหล่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต ทำให้เกิดการสร้างดีเอ็นเอ และ อาร์เอ็นเอในเซล (Thoma , 1977) แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะ มีทั้งอินทรีย์สาร (Organic nitrogen) เช่น เปปโตน ซอยโตน และอนินทรีย์สาร (Inorganic nitrogen) เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต เป็นต้น ในการผลิตสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่ มักจะเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนที่มีความซับซ้อน ซึ่งจุลินทรีย์นำไปใช้ได้อย่างช้าๆ เพื่อลดการสะสมของเกลือแอมโมเนียมที่อาจเป็นพิษต่อเซล อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนในการผลิตสารปฏิชีวนะแตกต่างกันไป เช่น คอร์นมิลเหมาะสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะชนิด LI-F03 ใน *Bacillius polymyxa* (Kurusa and Ohba , 1967) เปปโทนเหมาะสำหรับการผลิต AFV ใน *Bacillus subtilis* (Fiddaman and Rossall , 1994) กรดกลูตามิกเหมาะสำหรับการผลิต Surfactin ใน *Bacillus subtilis* (Kluge et al., 1988) ในขณะที่คอร์นสตีฟลิเคอว์ เหมาะสำหรับการผลิต Penicillin ใน *Penicillium chrysogenum* (Thoma , 1977)

แหล่งธาตุปริมาณน้อย (Trace element)

พบว่าในการสังเคราะห์เมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary Metabolite) โดยเฉพาะสารปฏิชีวนะนั้น แหล่งธาตุปริมาณน้อย มีความสำคัญและมีบทบาทช่วยส่งเสริมการสร้าง (Lichstein , 1983) ธาตุปริมาณน้อยบางชนิดเช่น เหล็ก จะทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ในการทำงานของเอ็นไซม์บางอย่าง (Martin and Demain , 1989) สำหรับธาตุปริมาณน้อย ที่มีบทบาทสำคัญในการสร้างสารปฏิชีวนะได้แก่ เหล็ก สังกะสี และ แมงกานีส ตามลำดับ โดยพบว่า เหล็ก เป็นตัวสำคัญสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะในแอกติโนมัยซิส สังกะสีเป็นตัวสำคัญในการผลิตสำหรับเชื้อรา และแมงกานีสเป็นตัวสำคัญในการผลิตในแบคทีเรีย (Weinberg , 1970)

2. ความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากค่าความเป็นกรดด่างจะมีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์ ในกระบวนการเมตาบอลิสมของจุลินทรีย์เอง โดยทั่วไปค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป ในกรณีของราและยีสต์จะเจริญได้ใน

ช่วงค่าความเป็นกรดด่างค่อนข้างต่ำ แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่จะเจริญที่ค่าความเป็นกรดด่างที่เป็นกลาง เป็นต้น

3. อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการสร้างสารปฏิชีวนะอย่างหนึ่ง ทั้งนี้เพราะอุณหภูมิจะมีส่วนสำคัญในการทำให้เมตาบอลิสมของจุลินทรีย์เป็นไปอย่างปกติ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์กับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารปฏิชีวนะนั้นมักจะไม่ใช่อุณหภูมิเดียวกัน เช่น *Penicillium chrysogenum* ซึ่งสามารถสร้างสารปฏิชีวนะเพนนิซิลินนั้น จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 ^{0} ซ. แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเพนนิซิลินจะผลิตได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 25 ^{0} ซ. เป็นต้น (Hugo and Rossal , 1984)

4. การให้อากาศ

การให้อากาศมีความสำคัญต่อจุลินทรีย์มาก โดยจะเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากจุลินทรีย์จะต้องใช้ออกซิเจนในกระบวนการเมตาบอลิสม และนอกจากนี้การให้อากาศ ยังช่วยให้จุลินทรีย์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อได้มากขึ้น ทำให้มีการใช้สารอาหารได้ดีขึ้น การเพิ่มปริมาณออกซิเจนสามารถทำได้ง่ายๆ โดยการเขย่าหรือการกวนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าในระดับที่มีการเลี้ยงจุลินทรีย์มากๆ เช่น ในถังหมัก จะต้องมีระบบการให้อากาศ (Aeration) ร่วมกับการกวน (Agitation) เพื่อเป็นการเพิ่มออกซิเจนในระบบ

การสกัดแยกสารปฏิชีวนะ (Isolation method)

สารปฏิชีวนะเมื่อผลิตได้มักอยู่ในรูปของผสม (Mixture) ระหว่างสารปฏิชีวนะเอง หรือมีสิ่งเจือปนอื่นๆ(Impurity) ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อกิจกรรมของสารปฏิชีวนะได้ (Voet , 1995) จึงจำเป็นต้องสกัดแยกสารปฏิชีวนะโดยมีจุดประสงค์ให้ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น เพื่อประโยชน์ในการศึกษาทางโครงสร้างโมเลกุลหรือการจัดจำแนกชนิดของสารปฏิชีวนะ และสามารถนำสารปฏิชีวนะไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆต่อไป การจะเลือกใช้วิธีใดนั้นขึ้นอยู่กับลักษณะและโครงสร้างทางเคมีของสารปฏิชีวนะเอง การสกัดแยกสารปฏิชีวนะสามารถทำได้ด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

1. การสกัดแยกโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (Extraction by organic solvent)

เป็นวิธีที่เหมาะสำหรับสารปฏิชีวนะที่มีขั้ว (Polar antibiotics) เป็นวิธีที่ค่อนข้างจะให้ความจำเพาะสูง ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้ได้แก่ เอทิลอะซิเตด เอมิลอะซิเตด คลอโรฟอร์ม ไดเอทิลอีเทอร์ บิวทานอล (Okazaki et al., 1975)

2. โครมาโตรกราฟี (Chromatography)

เป็นการอาศัยความแตกต่างในด้านสมบัติของสารที่ต้องการจะแยก เช่น สมบัติการละลาย ขนาดโมเลกุล ประจุบนโมเลกุล จึงทำให้โครมาโตรกราฟีมีได้หลายแบบ ไม่ว่าจะเป็นโครมาโตรกราฟีแบบกระดาษ (Paper chromatography) โครมาโตรกราฟีแบบคอลัมน์ (Column chromatography) โครมาโตรกราฟีแบบเยื่อบาง (Thin layer chromatography) โครมาโตกราฟีแบบสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography) เป็นต้น ซึ่งสามารถเลือกใช้ได้ตามความเหมาะสม และอาจใช้หลายวิธีร่วมกันเพื่อให้สารปฏิชีวนะมีความบริสุทธิ์มากขึ้น

3. การตกตะกอน (Precipitation)

ในการตกตะกอนสารปฏิชีวนะ สามารถใช้สารตกตะกอนได้หลายอย่าง เช่น เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (Kluge et al., 1988) กรดไฮโดรคลอริก (Shoji et al., 1977) เป็นต้น

ได้มีการทดลองทำสารปฏิชีวนะให้บริสุทธิ์ โดยนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่ม โดยได้อาศัยหลักการดังที่กล่าวมาข้างต้น ตัวอย่างเช่น

ในปี คศ. 1977 Shoji และคณะ ทำการศึกษาสารปฏิชีวนะ Polymyxin T1 และ Polymyxin S1 โดยนำน้ำใสที่ได้จากการปั่นแยกเซลออกแล้ว (Supernate) ที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus subtilis* มาตกตะกอนด้วยกรดไฮโดรคลอริก ทำให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นจึงนำมาผ่านคอลัมน์โครมาโตรกราฟีที่ตัวค้ำจุนแอมเบอร์ไลท์ ไออาร์ซี-50 (Amberlite IRC-50) แล้วมาสกัดแยกอีกครั้งด้วยบิวทานอล สารปฏิชีวนะที่ได้นำมาทำโครมาโตรกราฟีแบบกระดาษ จะได้สารปฏิชีวนะกึ่งบริสุทธิ์

ในปี คศ. 1988 Kluge และคณะ ศึกษาสารปฏิชีวนะ Surfactin ซึ่งจัดเป็นสารปฏิชีวนะแบบไลโพเพปไทด์ (Lipopeptide antibiotic) และทำให้กึ่งบริสุทธิ์ ซึ่งสกัดแยกออกจากเซลโดยใช้เอ็นไซม์ไลโซไซม์ร่วมกับการทำเฟรนเพรส (French press

treatment) นำสารสกัดจากเซลที่ได้มาตกตะกอนด้วยสเตรปโตมัยซินซัลเฟต ตามด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 10% และ 80% นำสารปฏิชีวนะที่ได้ไปละลายในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม จะได้สารปฏิชีวนะ Surfactin

ในปี คศ. 1989 Konishi และคณะ ทำการแยกสารปฏิชีวนะกลุ่มเพปไทด์ชนิดใหม่ที่มีชื่อว่า Cispentacin โดยการนำน้ำใสที่ได้จากการปั่นแยกเซลออกแล้วที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus cereus* มาผ่านคอลัมน์โครมาโตรกราฟีที่ตัวค้ำจุนเป็นแอมเบอร์ไลท์ ไออาร์-120 (Ambolite IR-120) และคอลัมน์โดเวก 50 ดับบิว (Dowex 50 W) ตามลำดับ นำมาตกตะกอนอีกครั้งด้วยอะซิโตน-เอทานอล-น้ำ จะได้สารปฏิชีวนะ Cispentacin

ในปี คศ. 1992 Antanio และคณะ ศึกษาสารปฏิชีวนะ A12- C ซึ่งจัดเป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่มเพปไทด์ สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้โดยนำน้ำใสที่ได้จากการปั่นแยกเซลออกแล้วที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus licheniformis* มาผ่านคอลัมน์คิว-เซฟาโรส (Q-sepharose) ซุปเปอร์โคซิล แอลซี-18 (Supercosil LC-18) และไวเดกซ์ซี-18 (Vydex C18) ตามลำดับ จากกระบวนการดังกล่าวจะได้สารปฏิชีวนะ A12 - C ที่สามารถยับยั้งการเจริญทั้ง แบคทีเรีย รา และยีสต์

การแยกสารปฏิชีวนะและทำให้บริสุทธิ์เพื่อใช้ประโยชน์ในการศึกษา และการประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ การใช้วิธีดังที่กล่าวมาข้างต้นนั้นอาจจะเหมาะสำหรับ เฉพาะในห้องปฏิบัติการหรือในอุตสาหกรรมที่มีขนาดเล็ก โดยอาจใช้วิธีใดวิธีหนึ่ง หรือหลายๆวิธีร่วมกัน แต่ถ้ามีการทำในระดับอุตสาหกรรมใหญ่ๆ อาจจะต้องปรับปรุงวิธีการเก็บเกี่ยวผลผลิตเพื่อให้ได้สารเป็นปริมาณมากๆ และต้องคำนึงถึงค่าใช้จ่ายควรจะต้องคุ้มค่ากับการลงทุนด้วย

พลสมุทรการ ... จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

สารปฏิชีวนะจัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความสำคัญมากในปัจจุบัน ซึ่งนอกจากจะมีจุดประสงค์หลักในการใช้เป็นยารักษาโรคแล้ว ยังมีการประยุกต์ใช้ในหลายๆด้าน เช่น ใช้เป็นสารถนอมอาหาร สารเร่งการเจริญในสัตว์ และการควบคุมทางชีวภาพ ในการใช้ประโยชน์ในแง่ยารักษาโรคติดเชื้อนั้นมีความต้องการเป็นปริมาณสูงขึ้นทุกปี และความต้องการสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ๆ ก็ยังคงเป็นที่ต้องการเนื่องจากในปัจจุบันมีเชื้อก่อโรคหลายชนิดสามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะจนกลายเป็นเชื้อดื้อยา และยังไม่มีสารปฏิชีวนะชนิดใดที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ทุกชนิด ด้วยเหตุผลเหล่านี้เองจึงทำให้มีงานวิจัยที่พยายามค้นคว้าสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ และปรับปรุง(modify) สารปฏิชีวนะอยู่อย่างต่อเนื่อง

งานวิจัยในครั้งนี้ได้แยกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ SR-1 จากตัวอย่างหนังสัตว์อาบน้ำยาเคมีที่มีการติดเชื้อ พบว่าสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญเชื้อรากลุ่มที่สามารถขึ้นเฉพาะบนหนังสัตว์(Dominant fungi) ไม่ว่าจะเป็น *Paecilomyces variotii* และ *Gliocladium* sp. นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย และยีสต์ก่อโรคได้อีกด้วย จึงมีจุดประสงค์ที่จะหาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารปฏิชีวนะได้สูงในระดับขวดเขย่า สกัดแยกสารปฏิชีวนะและทำให้บริสุทธิ์บางส่วน และศึกษาสมบัติของสารปฏิชีวนะบางประการ เพื่อประโยชน์ในการศึกษาขั้นสูงต่อไป